犊牛腹泻产气荚膜梭菌的毒素基因分型与耐药性分析
——以山东省某规模奶牛场为例

刘芝美

沂南县大庄畜牧兽医站，山东临沂 276305

摘　要：[目的]为查明山东省某规模化奶牛场腹泻犊牛病因及病原体耐药性，研究采集病料进行病原学鉴定和耐药性分析。[方法]无菌采集病死犊牛肠系膜、肺脏、脾脏等组织病料装入采样袋，共18 份，通过细菌分离培养及生化试验，细菌16S rRNA进行PCR扩增和毒素分型鉴定，运用K-B琼脂扩散纸法对分离菌株耐药性试验，PCR电泳检测14 种耐药基因。[结果]结果显示，5 株C型产气荚膜梭菌被检出，检出率为27.8%。分离菌对多种抗生素表现耐药性，β-内酰胺类、氨基糖苷类、磺胺类和氯霉素类耐药基因均有检出。[结论]研究结果表明，C型产气荚膜梭菌是引起奶牛场腹泻犊牛发病的致病菌，且对部分抗生素表现耐药性。该研究结果为奶牛场产气荚膜梭菌防控提供参考。

关键词：腹泻犊牛；产气荚膜梭菌；毒素基因分型；耐药性

文章编号：1671-4393（2025）08-0054-07　　DOI:10.12377/1671-4393.25.08.09

0 引言

犊牛腹泻是奶牛养殖业中常见的肠道疾病，造成奶牛养殖业严重经济损失。其病因包括感染性和非感染性因素，其中感染性因素以细菌性、病毒性和寄生虫性为主，是新生奶牛发病和死亡的重要原因。产气荚膜梭菌（Clostridium perfringens，CP）是一种广泛分布的革兰氏阳性厌氧芽孢杆菌，根据产生的毒素可分为A～G型[1]。其中，C型菌株常导致犊牛腹泻[2]，产生α和β毒素，与特定疾病综合症相关，且发病急、病程短、传播快，死亡率高。据报道，该病年发病率1.0%～2.5%，病死率可达100%[3]。

位于山东中南地区的某规模化奶牛场，奶牛存栏865 头。2024年9月，该场相继有5 头奶牛犊突发急性疾病，表现为持续性腹泻、便血及胃部腹胀等症状，病程短促且死亡迅速。尽管采取抗生素治疗，但病情未见明显改善，最终导致4 头犊牛死亡。笔者采集病

作者简介：刘芝美（1980-），女，山东沂南人，本科，高级兽医师，研究方向为动物医学。

中国乳业线上阅读

死犊牛的组织器官、肠道内容物等病料，并将其送至实验室进行病原菌检测。通过对分离菌株的耐药性分析，并结合对症治疗，提出针对性的防控建议，为奶牛场的疫病防治提供参考。

1 材料与方法

1.1 病料来源

询问畜主、观察临床症状和剖检病理变化后，初步怀疑由产气荚膜梭菌感染所致。无菌采集病死犊牛肠系膜、肺脏、脾脏等组织病料装入采样袋，共18 份，2~5 ℃保存备检。

1.2 主要试剂和仪器

胰胨-亚硫酸盐-环丝氨酸（TSC）琼脂、液体硫乙醇酸盐培养基（FTM）、缓冲动力-硝酸盐培养基、乳糖-明胶培养基、硝酸盐还原试剂，青岛海博生物科技有限公司；0.1%蛋白胨水、含铁牛乳培养基，本实验室制备。

16S rRNA细菌菌种鉴定PCR试剂盒，2×Taq PCR MasterMix，生工生物工程（上海）股份有限公司；HS-150L恒温恒湿培养箱，青岛聚创环保集团有限公司；伯乐T100 PCR仪，北京世纪科信科学仪器有限公司；WD-9413B凝胶成像分析系统，北京六一仪器厂。

1.3 细菌分离培养及生化试验

按照GB 4789.13—2012检测标准[4]，取25 g病料研磨后，加入225 mL的0.1%蛋白胨水均质化，取1 mL接种于TSC琼脂平板，50 ℃水浴凝固后，37 ℃厌氧培养20 h。挑选5 个典型黑色菌落接种于FTM，同样条件下培养20 h以备后续试验。对FTM培养液进行革兰氏染色镜检，观察菌体特征，并接种于含铁牛乳培养基，观察“暴烈发酵”。同时，穿刺接种缓冲动力-硝酸盐培养基，加硝酸盐还原试剂，检测菌的动力和硝酸盐还原能力。将FTM培养液划线接种于乳糖-明胶培养基，37 ℃培养24 h，观察乳糖发酵和明胶液化情况。

1.4 细菌 16S rRNA 的 PCR 检测和菌种鉴定

挑取FTG细菌纯化培养液，按照传统的酚/氯仿方法提取细菌DNA，参考16S rDNA细菌菌种鉴定PCR试剂盒说明书、对细菌进行PCR扩增，16S rDNA鉴定引物序列：F：GAGCGGATAACAATTTCACACAGG、R：CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC，目的条带长度500 bp。使用切胶回收试剂盒进行阳性扩增产物回收，送生工生物工程（上海）股份有限公司测序，测序结果在NCBI数据库进行BLAST比对，以确定菌种。

1.5 毒素分型鉴定

参考缪西鹏等[5]建立的多重PCR方法，分别设计4 对毒素α、β、ε、ι的鉴定引物，引物由生工生物工程（上海）股份有限公司合成（表1）。PCR反应体系为40 μL：20 μL 2×Taq PCR Mix，3 μL分离菌DNA模板，4 μL上、下游引物（各2 μL），补足ddH_2O。反应程序为：94 ℃ 5 min；94 ℃ 25 s，58.7 ℃ 30 s，72 ℃ 45 s，运行30 个循环，72 ℃ 5 min终延伸。取10 μL PCR产物、用1.2%琼脂糖凝胶中电泳检测、凝胶成像

表 1 毒素分型鉴定引物生物学信息

基因	毒素类型	引物序列（5′→3′）	长度（bp）
CPA	α	GCTAATGTTACTGC-CGTTGA CCTCTGATACATCGT-GTAAG	324
CPB	β	GCGAATATGCT-GAATCATCTA GCAGGAACATTAG-TATATCTTC	196
ETX	ε	GCGGTGATATC-CATCTATTC CCACT-TACTTGTCCTACTAAC	655
ITX	ι	ACTACTCTCAGA-CAAGACAG CTTTCCTTCTATTAC-TATACG	446

中国乳业线上阅读

系统观察结果并拍照。检测结果根据Rood等[6]确定的毒素分型方案判定细菌类型（表2）。

表 2 4 种主要毒素最新分型方案

细菌类型	毒素类型			
	α（CPA）	β（CPB）	ε（ETX）	ι（ITX）
A	+	−	−	−
B	+	+	+	−
C	+	+	−	−
D	+	−	+	−
E	+	−	−	+

1.6 药敏试验

采用美国临床和实验室标准协会（CLSI）[7]推荐的K-B琼脂扩散纸片法，对分离菌株进行5 类15 种常用抗生素的药敏试验，包括β-内酰胺类、氟喹诺酮类、氯霉素类、氨基糖苷类、磺胺类。根据抑菌圈直径及CLSI标准，以耐药（R）、中介（I）和敏感（S）表示菌株不同耐药性，并以大肠埃希菌ATCC25922为质控菌株。

1.7 耐药基因检测

参考文献[8]设计合成五类14 种耐药基因引物（表3），由生工生物工程（上海）股份有限公司合成。PCR反应体系为25 μL，含12.5 μL 2×Taq Mix、1 μL模板DNA、1 μL上、下游引物混合液（各0.5 μL，10 pmol/μL），加ddH_2O补足。PCR反应条件：94 ℃预变性8 min；95 ℃变性40 s，55～64 ℃退火30 s，72 ℃延伸1 min，共35 个循环；最后72 ℃延伸10 min。PCR产物经1.2%琼脂糖凝胶电泳检测并拍照记录。

2 结果

2.1 临床症状和病例剖检结果

犊牛突发疾病，表现为体温正常、食欲丧失、行动困难、腹部膨胀、腹泻便血、间歇性抽搐及磨牙，症状出现后1～2 天死亡。剖检发现皱胃和肠道病变显著，皱胃扩张含出血性液体与气体，黏膜呈弥漫性、出血性、坏死性炎症；肠道充满酸臭气体，伴有十二指肠出血性肠炎、小肠结肠炎及溃疡，肠系膜淋巴结肿大出血。

2.2 细菌培养和生化试验结果

镜检显示短粗、两端钝圆的蓝紫色革兰氏阳性菌（图1A）。细菌培养显示“暴烈发酵”，细菌在含铁牛乳培养基上产生海绵状物质（图1B），乳糖-明胶试验培养基变黄且液态（图1C），表明细菌发酵乳糖并凝固酪蛋白、液化明胶。TSC培养基上形成黑色菌落（图1D），动力-硝酸盐培养基细菌无动力，仅沿穿刺线生长且变红（图1E），显示硝酸盐还原。FTM培养基变浑浊（图1F）。综合判断，5株分离菌符合产气荚膜梭菌特征。

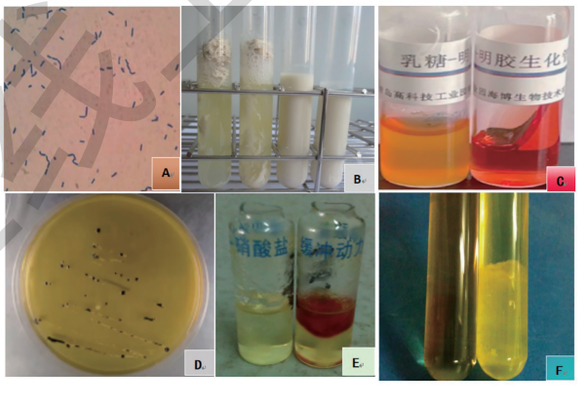


图 1 A: 革兰氏染色镜检（1 000×）；B: “暴烈发酵”试验；C: 乳糖明胶试验；D: TSC 培养基；E: 动力 – 硝酸盐试验；F: FTM 试验

2.3 细菌 16S rRNA 的 PCR 检测和菌种鉴定结果

利用16S rRNA引物PCR扩增细菌DNA，在500 bp处出现一条特异性条带（图2），与预期相符，

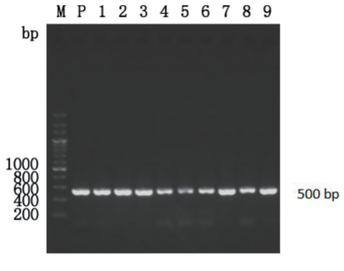


图 2 细菌 16S rRNA 基因 PCR 扩增电泳检测结果

中国乳业线上期刊

表 3 耐药基因引物

抗生素种类	耐药基因	引物序列（5′→3′）	长度（bp）	退火温度（℃）
β－内酰胺类	bla_{CMY}	F：GTGGTGGATGCCAGCATCC R：GGTCGAGCCGGTCTTGTTGAA	915	59
	bla_{TEM}	F：GGTTATGCGTTATATTCGCC R：TTAGCGTTGCCAGTGCTC	627	56
	bla_{SHV}	F：GATCAGTTGGGTGCACGAGT R：AATGATACCGCGAGACCCAC	753	55
磺胺类	Sul1	F：ATCTCACCGACCACTCCTTC R：ACGCCGACTTCAGCTTTT	388	55
	Sul2	F：CATCATTTTCGGCATCGTC R：TCTTGCGGTTTCTTTCAGC	793	64
	Sul3	F：TGTGCGGATGAAGTCAGCTC R：CGGCATCGTCAACATAACC	720	55
氨基糖苷类	ant（6 ' ）－Ⅰa	F：ACTGGCTTAATCAATTTGGG R：GCCTTTCCGCCACCTCACCG	577	56
	aph（2″ ）－Ⅰb	F：CTTGGACGCTGAGATATATGAGCAC R：GTTTGTAGCAATTCAGAAACACCCTT	627	58
	aph（2″ ）－Ⅰc	F：CCACAATGATAATGACTCAGTTCCC R：CCACAGCTTCCGATAGCAAGAG	444	60
	aph（2″ ）－Ⅰd	F：GTGGTTTTTACAGGAATGCCATC R：CCCTCTTCATACCAATCCATATAACC	641	62
氟喹诺酮类	tetL	F：TGGTGGAATGATAGCCCATT R：CAGGAATGACAGCACGCTAA	616	56
	gyrA	F：CGCCGTATTTTGTATGGGATG R：GTTCCGTAACCAGAAGGTT	377	55
	parC	F：AAGGACGGCAACACTTTTGAC R：AGTGGGTTCTTTTTCCGTATC	312	55
氯霉素类	floR	F：AACCCGCCCTCTGGATCAAGTCAA R：GCACCAGCCCCAACGAAACCAGTA	475	55

测序结果在NCBI数据库利用BLAST比对，与产气荚膜梭菌参考菌株（GenBank登录号：AB477827、MK599267、、KT020575）核苷酸同源性为98.78%以上，证实细菌为产气荚膜梭菌，检出率为27.8%。

2.4 毒素分型鉴定结果

利用4 种毒素基因引物从5 株细菌分离株提取的DNA 中均PCR扩增出324 bp的α毒素基因片段、196 bp的β毒素基因片段（图3）。其他ε、ι毒素未检

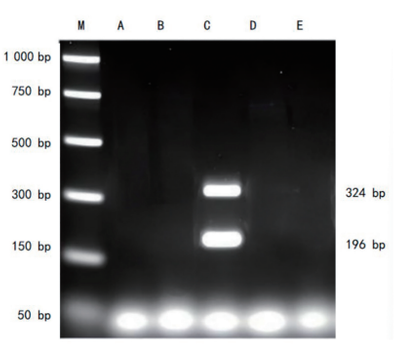


图 3 α、β 毒素 PCR 扩增电泳结果

中国乳业线上阅读

出。说明5 株细菌DNA同时包含α、β两种毒素，由此判断5 株分离菌均为C型产气荚膜梭菌。

2.5 药敏试验结果

药敏试验结果见表4。5 株分离菌对阿莫西林、卡那霉素、庆大霉素、复方新诺明耐药率均为100%，对氧氟沙星、氟苯尼考、恩诺沙星耐药率均为0，对其余抗生素存在不同程度耐药。

2.6 耐药基因检测结果

5 株产气荚膜梭菌在β-内酰胺类耐药基因中blaCMY检出率最高，为100%（5/5），blaTEM和blaSHV均未检出。氨基糖苷类耐药基因中aph（2″）-Ⅰb检出率最高，为80%（4/5），ant（6'）-Ⅰa、aph（2″）-Ⅰc和aph（2″）-Ⅰd均未检出。磺胺类耐药基因中sul1、sul2、sul3检出率分别为20%（1/5）、40%（2/5）、60%（3/5）。氯霉素类耐药基因floR检出率为80%（4/5）。氟喹诺酮类耐药基因未检出。每株分离菌检出耐药基因数为3～4 种。

3 讨论

奶牛产气荚膜梭菌病四季可发，多为零星病例。根据症状分为最急性、急性和亚急性，以最急性和急性为主，表现为便血、腹部膨胀、腹泻，偶见神经症状。该病由条件性致病菌产气荚膜梭菌引起，奶牛在感染免疫抑制疾病、处于环境应激状态、饲养管理条件差等免疫低下时易感[9, 10]。笔者从某奶牛场疑似病例中采集18 份病料，分离鉴定出5 株C型产气荚膜梭菌，检出率为27.8%，表明其为本次犊牛腹泻死亡的主要原因之一。相比常丽云等[11]报道唐山地区11.55%、孙阳阳等[12]报道山东部分地区12.5%，本研究检出率较高，可能与样本数量有限有关，需进一步监测并扩大抽样。该病主要影响集约饲养的犊牛，发病率低但死亡率高，特征为发病急、猝死，伴有小肠出血坏死及皱胃炎。调查发现，感染犊牛以精料为主，日粮中小麦比例突然增加，加之连续阴雨、地面潮湿、圈舍卫生差，导致菌群失衡、产气荚膜梭菌增殖。

表4 5种分离菌株耐药性试验结果

抗生素种类	药物名称	CLSI判断标准			菌株数（株）			耐药率（%）
		R	I	S	R	I	S	
β-内酰胺类	头孢曲松	≤13	14～22	≥23	1	0	4	25
	氨苄西林	≤12	13～17	≥18	3	1	1	60
	阿莫西林	≤13	14～16	≥17	5	0	0	100
	青霉素	≤17	18～20	≥21	2	0	3	40
氨基糖苷类	卡那霉素	≤15	16～19	≥20	5	0	0	100
	链霉素	≤12	13～14	≥15	3	0	2	60
	庆大霉素	≤13	14～17	≥18	5	0	0	100
磺胺类	复方新诺明	≤14	15～18	≥19	5	0	0	100
	磺胺异恶唑	≤11	12～17	≥18	4	0	1	80
氟喹诺酮类	氧氟沙星	≤14	15～18	≥19	0	1	4	0
	环丙沙星	≤15	16～20	≥21	1	1	3	20
	恩诺沙星	≤14	15～19	≥20	0	2	3	0
氯霉素类	氟苯尼考	≤12	13～17	≥18	0	2	3	0

中国乳业线上阅读

早期调查根据主要致死毒素将产气荚膜梭菌分为A、B、C、D、E 5种类型。 2017年扩展到7 种类型（A～G）[6]。其中C型毒力较强，是动物发病的主要致病菌株。C型产气荚膜梭菌菌株被定义为携带2 个分型毒素基因CPA（编码α毒素）、CPB（编码β毒素）。因此，α和β毒素被认为是该微生物的主要毒力因子。此外，一些C型菌株可产生多种其他毒素，但不用于分型，如β2毒素 （CPB2）、产气荚膜溶血素（PFO）和大梭菌毒素Tpel[13]。α毒素是产气荚膜梭菌的主要致死毒素，是一种多功能磷脂酶，位于染色体上，高度保守，几乎所有产气荚膜梭菌分离株产生不同量α毒素，引起不同细胞内膜磷脂的水解。β毒素是一种对胰蛋白酶高度敏感的蛋白质，在细胞膜上形成阳离子选择性低聚物孔，导致 Ca^{2+}、Na^{+}和 Cl^{-}流入，引起细胞肿胀和裂解，导致黏膜坏死，从而在家畜中观察到中枢神经症状[13，14]。β毒素是造成C型产气荚膜梭菌感染疾病发展的原因。目前，对于产气荚膜梭菌的实验室检测主要采用血清学（如ELISA）、PCR为主的分子生物学方法，后者灵敏度和特异性优于前者。笔者用产气荚膜梭菌4 种毒素基因特异性引物，对鉴定为产气荚膜梭菌的5 株分离菌DNA进行PCR扩增，均得到与α和β毒素两条目的条带吻合的阳性PCR产物，符合C型产气荚膜梭菌特点，证实5 株分离菌为C型产气荚膜梭菌。

抗生素耐药性、耐药基因流行是公共卫生重要问题。笔者检测5 株分离菌进行耐药性、耐药基因，发现对阿莫西林、卡那霉素、庆大霉素、复方新诺明耐药性强，对氧氟沙星、氟苯尼考、恩诺沙星敏感，符合相关文献。产气荚膜梭菌的抗生素耐药性存在地区差异，与用药习惯、菌株类型、饲养环境等相关[15]。氨基糖苷类药物主要作用于细菌体内的核糖体，抑制细菌蛋白质合成，细菌产生钝化酶使氨基糖苷类药物失去抗菌活性[16]。氟喹诺酮类药物耐药机制主要有主动外排机制、质粒介导、细菌外膜通透性改变等[17]。floR基因存在于细菌质粒上，可在菌株间相互传播。β-内酰胺类药物耐药的主要机制依赖β-内酰胺酶作用，blaCMY-2编码 AmpC型β-内酰胺酶，可水解第三代头孢菌素[18]。磺胺类药物是合成抗菌剂，用作对抗细菌感染的抑菌药物，其耐药性是由于二氢蝶酸合酶（DHPS）、sul基因产生。笔者检测出4 类抗生素6 种耐药基因，存在多重耐药情况，表明分离菌携带耐药基因数量较多，耐药机制较复杂，给本病治疗和防控带来压力。

参考文献

[1] Abo Elyazeed H，Elhariri M，Eldeen N E，et al.Genetic diversity and phylogenetic relationships of Clostridium perfringens strains isolated from mastitis and enteritis in Egyptian dairy farms[J].BMC Microbiology，2024，24（1）：157.

[2] Rings D M.Clostridial disease associated with neurologic signs：Tetanus，botulism，and enterotoxemia[J].The Veterinary Clinics of Norths America，2004，20：379-391.

[3] 候子栋，祖新政，翁业斌，等.规模化奶牛养殖场犊牛梭菌性肠炎的诱发因素和防制[J].草食家畜，2020（6）：32-36.

[4] 中华人民共和国卫生部.GB 4789.13-2012 食品安全国家标准 食品微生物学检验 产气荚膜梭菌检验[S].

[5] 缪西鹏，高瑞，谢玉杰，等.产气荚膜梭菌多重PCR检测方法的建立及初步应用[J].中国兽医学报，2022，42（8）：1591-1596.

[6] Rood J I，Adams V，Lacey J，et al.Expansion of the Clostridium perfringens toxin-based typing scheme[J].Anaerobe，2018，53：5-10.

[7] CLSI.Performance standards for antimicrobial susceptibility testing，M100，31st ed[S].Clinical and Laboratory Standards Institute，Wayne，PA，2021.

[8] 徐民生，柯海意，施科达，等.广东省猪传染性胸膜肺炎放线杆菌分离鉴定及耐药表型和耐药基因检测与分析[J].中国畜牧兽医，2022，49（8）：3212-3225.

[9] 郝荣进.山羊产气荚膜梭菌感染的诊断及防治方法[J].特种经济动植物，2024，27（10）：83-85.

[10] 吴克，王娟，杨增岐.动物源产气荚膜梭菌致病因子和耐药性研究进展[J].中国兽医杂志，2024，60（3）：84-89.

[11] 常丽云，刘志勇，李华伟，等.唐山地区奶犊牛主要腹泻相关病原的流行病学调查[J].中国畜牧兽医，2023，50（7）：2854-2864.

[12] 孙阳阳，范学政，杨美，等.奶牛产气荚膜梭菌的分离鉴定与药物敏感性分析[J].中国畜牧兽医，2020，47（8）：2588-2595.

[13] Posthaus H，Kittl S，Tarek B，et al.Clostridium perfringens type C necrotic enteritis in pigs：Diagnosis，pathogenesis，

中国乳业线上阅读

and prevention[J].Journal of Veterinary Diagnositic Investigation，2020，32（2）：203–212.
[14] Hoonakker M，Zariri A，De Brouwer L，et al.An in vitro assay for toxicity testing of Clostridium perfringens type C β–toxin[J].Frontiers in Immunology，2024，15：1373411.
[15] 张仕泓，王少林.动物源产气荚膜梭菌耐药性研究进展[J].畜牧兽医学报，2021，52（10）：2762–2771.
[16] 刘海燕，殷瑜.氨基糖苷类抗生素作用机制研究进展[J].中国抗生素杂志，2019，44（11）：1283–1287.
[17] 王垚，吴疆.质粒介导喹诺酮类药物耐药机制的研究现状及进展[J].西部医学，2015，27（7）：1108–1112.
[18] Call D R，Singer R S，Meng D，et al.blaCMY–2–positive IncA/C plasmids from Escherichia coli and Salmonella enterica are a distinct component of a larger lineage of plasmids[J].Antimicrobial Agents and Chemotherapy，2010，54（2）：590–596.

Genotyping and Drug Resistance Analysis of Toxin Genes in Clostridium perfringens from Calf Diarrhea ––A Case Study of a Large–scale Dairy Farm in Shandong Province

LIU Zhimei
Da Zhuang Animal Husbandry and Veterinary Station，Yinan County，Linyi Shandong 276305

Abstract：[Objective] In order to find out the etiology and pathogen resistance of diarrhea calves in a large-scale dairy farm in Shandong Province，the pathogenic identification and drug resistance analysis were carried out. [Method] A total of 18 samples of mesenteric，lung，spleen and other tissues of dead calves were collected aseptically and put into sampling bags. Through bacterial isolation and culture and biochemical test，bacterial 16 S rRNA was amplified by PCR and toxin typing was identified. The K-B agar diffusion paper method was used to test the drug resistance of the isolated strains，and 14 drug resistance genes were detected by PCR electrophoresis. [Result] The results showed that 5 strains of C.perfringens type C were detected，and the detection rate was 27.8%. The isolated bacteria showed resistance to a variety of antibiotics，and β-lactams,aminoglycosides，sulfonamides and chloramphenicol resistance genes were detected. [Conclusion] The results showed that C.perfringens type C was the pathogenic bacteria causing diarrhea in calves on dairy farms，and it was resistant to some antibiotics. The results of this study provide a reference for the prevention and control of Clostridium perfringens in dairy farms.

Keywords：diarrhea calves；clostridium perfringens；toxin genotyping；drug resistance

中国乳业线上阅读